

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-330797

(43)Date of publication of application : 19.12.1995

(51)Int.Cl.

C07K 14/78  
// C12N 15/09  
C12P 21/02  
(C12P 21/02  
C12R 1:19 )

(21)Application number : 06-152578

(71)Applicant : SUMITOMO METAL IND LTD

(22)Date of filing : 31.05.1994

(72)Inventor : SAITOU SUKENAO  
TAKAGI JUNICHI  
SAITO TAKASHI  
SUDO YOSHIMITSU  
SHIMIZU AKIRA  
OKUNO TSUGUHIRO

## (54) NEW CELL ADHESION-ACTIVE PEPTIDE

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain the subject new peptide found in the propolypeptide of the von Willebrand's disease factor, having a specific amino acid sequence, having an activity to specifically adhere to a myeloma cell, and useful for medicines effective for inhibiting cancer metastasis, etc.

**CONSTITUTION:** This new cell adhesion-active peptide is found in the propolypeptide of the von Willebrand's disease factor (pp-vWF), has an amino acid sequence of the formula or the sequence wherein one or more amino acids are added to, deleted from or substituted for thr amino acid sequence, has a cell adhesion activity specially to myeloma cells, and is useful for medicines effective in the inhibition of cancer metastasis, etc. The peptide is obtained by digesting the pp-vWF purified and isolated from bovine platelet by immunoaffinity chromatography with an enzyme, and subsequently separating and purifying the digestion product by reverse-phase high performance liquid chromatography.

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

Best Available Copy

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-330797

(43) 公開日 平成7年(1995)12月19日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C07K 14/78	ZNA	8318-4H		
// C12N 15/09				
C12P 21/02	C	9282-4B		
(C12P 21/02				
		9281-4B	C12N 15/00	A
	審査請求	未請求	請求項の数 2	書面 (全17頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-152578

(22) 出願日 平成6年(1994)5月31日

(71) 出願人 000002118

住友金属工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72) 発明者 斉藤 佑尚

神奈川県横須賀市若松町1-8

(72) 発明者 高木 淳一

東京都大田区北千束3-34-13 タケダマ  
ンション306号

(72) 発明者 斉藤 隆史

神奈川県横浜市緑区松風台21-13 松風学  
舎S-206号室

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規細胞接着活性ペプチド

(57) 【要約】

【目的】 フォンビルプラント因子のプロポリペプチド  
(p p - v W F) 中に見られる新規な細胞接着活性を有  
するペプチドを同定し、その生物学的機能を解明し、併  
せてその医学的応用を検討する。

【構成】 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列、ある  
いは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸  
が付加、欠失または置換されたアミノ酸配列をもち、か  
つ細胞接着活性を有するペプチド。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列、あるいは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失または置換されたアミノ酸配列をもち、かつ細胞接着活性を有するペプチド。

【請求項2】 メラノーマ細胞に対して特異的に接着する請求項1記載のペプチド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は新規な細胞接着活性ペプチドに関する。本発明の細胞接着活性ペプチドは特にメラノーマ細胞に対する顕著な細胞接着活性を示し、癌転移の阻止などの医薬用途に応用しうる。

## 【0002】

【従来技術】 組織を構築する細胞は、細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) とよばれるおもにフィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン、プロテオグリカンなどからなる網目状の構造体に取り囲まれて存在している。このECMへの細胞接着が、細胞の形態調節、増殖、分化、および細胞の移動などにおおいに関与している。このプロセスは特定の細胞表面レセプターと特定のマトリックスタンパク質との相互作用によって媒介される。表面レセプターの発現が異なるために、異なる細胞は異なるタンパク質と接着する。

【0003】 ところで多くの細胞が各種インテグリンを含む1以上のクラスのレセプターを介してフィブロネクチン、ラミニンおよびコラーゲンに接着することが知られている (Buck, C. A. et al., *Annu. Rev. Cell. Biol.* 3:179-205, 1987; Akiyama, S. K. et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1031:91-110, 1990)。これらの3つのタンパク質はECM中に多量に存在し、生理的条件下での組織の維持に重要であるが、この他にもインビトロでの細胞接着活性をもち、より特定された段階で重要な役割を果たすと考えられる多数のタンパク質が存在する。トロンボスポンジン (Sun, X. et al., *J. Cell. Biol.* 118:693-701, 1992)、テナシン (Spring, J. et al., *Cell* 59:325-334, 1989)、フィブリノゲン (Dejana, E. et al., *J. Cell. Biol.* 104:1403-1411, 1987)、ビトロネクチン (Pytela, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5766-5770, 1985) およびフォンビルブラント因子 (Dejana, E. et al., *J. Cell. Biol.* 109:367-375, 1989) がこれに含まれる。最近になって、これらの接着性糖タンパク質が、胚形成や形態発生に重要な役割を

2

果たしており (Sage, E. H. et al., *J. Biol. Chem.* 266:14831-14834, 1991)、あるいは血管障害後の創傷治癒に関与している (Plow, E. F. et al., *J. Biol. Chem.* 259:5388-5391, 1984) ことを示す膨大な証拠が提出されている。

【0004】 成熟フォンビルブラント因子 (von Willebrand factor: 以下vWFと略すことがある) は血液凝固VIII因子 (抗血友病因子) と複合体を形成している糖タンパク質である。vWFは血漿中を循環し、血小板およびコラーゲンの双方への結合を介して、内皮下層への血小板の接着を媒介すると考えられている (Houdijk, W. P. et al., *J. Clin. Invest.* 75:531-540, 1985; Fressinaud, E. et al., *Blood* 70:1214-1217, 1987)。

【0005】 vWFの大きな前駆体であるプレプロ-vWFがプロセシングされてプロ-vWFとなり、これがさらに2つの分子: vWFのプロポリペプチド (pp-vWF) および成熟vWFに開裂する (Wagner, D. D., *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6:217-246, 1990)。pp-vWFは非常に大きなプロポリペプチド (約100kDa) であって、フォンビルブラント抗原IIとも呼ばれている (Fay, P. J. et al., *Science* 232:995-998, 1986)。本発明者らは、成熟vWFとは異なり、pp-vWFがコラーゲンに結合し、かつコラーゲン誘導の血小板凝集を阻害することを発見した (Takagi, J. et al., *J. Biol. Chem.* 264:6017-6020, 1989; Takagi, J. et al., *J. Biol. Chem.* 264:10425-10430, 1989)。本発明者らはさらに、血小板および内皮細胞を刺激した際にこれらから放出されるタンパク質であるpp-vWFの生物学的機能を研究した。このタンパク質のコラーゲンへの結合性、ならびに血小板凝集の阻害作用から、本発明者らは該タンパク質がうつ血性血栓形成の負のフィードバック機構に関与することを推定した (Takagi, J. et al., *J. Biol. Chem.* 264:6017-6020, 1989)。最近になって、本発明者らは、pp-vWFがトランスグルタミナーゼである血液凝固第XIII因子の基質として作用し、またラミニンと特異的にクロスリンクすることを見いだした (Usui, T. et al., *J. Biol. Chem.* 268:12311-12316, 1993)。これらの知見は、pp-vWFが内皮下層ECM中に取り込まれて、細胞とECMとの相互作用に影響を及ぼすことを示唆する。

【0006】 さらに本発明者らは、pp-vWFの細胞

接着活性を検討し、pp-vWFがヒトメラノーマ細胞などの一定の細胞に対しての接着活性をもつことを見だし、またこの細胞接着活性はpp-vWF分子の中央付近ドメインを認識する抗体によって抑制されることを発表した(第66回日本生化学会講演要旨集、1993年8月25日)。

【0007】しかしながら、pp-vWFの詳しい生物学的機能ならびにpp-vWF中のどの部分が接着に関与しているのか、については依然として不明なままであった。

【0008】

【発明が解決すべき課題】したがって、本願発明の目的は、pp-vWFの細胞接着活性を同定し、かつpp-vWF中の細胞接着活性部位を特定してその生物学的機能を解明し、併せてその医学的用途を検討することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記目的を達成するために鋭意研究した結果、pp-vWFの中心付近から得られた8kDa断片がメラノーマ細胞に対して極めて特異的に接着することを発見して本発明を完成した。

【0010】すなわち、本願発明は、配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列、あるいは該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失または置換されたアミノ酸配列をもち、かつ細胞接着活性を有するペプチドを提供する。

【0011】本発明の細胞接着活性を有するペプチドは配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列によって例示されるが、これのみでなく、該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失または置換されたアミノ酸をもつものであっても、細胞接着活性を有する限り本発明に含まれる。例えば、3アミノ酸配列RGD(Arg-Gly-Asp)はフィブロネクチンの細胞接着活性を示す最小アミノ酸配列として同定され、ほとんどすべての細胞により認識される細胞接着シグナルであることが知られている(Pierschbacher, M. D. et al., Nature 309:30-33, 1984)。この他にもLDV(Leu-Asp-Val)ペプチドなどの接着シグナルが同定されている。したがって、配列番号2に示す配列の一部をもつ短いペプチドであってもそれが細胞接着活性を有する限り、本発明に含まれる。さらに、アミノ酸配列内の1もしくは複数のアミノ酸を他のアミノ酸、例えば置換すべきアミノ酸と類似の性質をもつアミノ酸で置換されたペプチドも細胞接着活性を保持する限り本発明に含まれる。また、配列番号2に示す配列、またはその一部の配列に1または複数のアミノ酸が付加したペプチドも細胞接着活性を有する限り本発明に含まれる。例えば、本発明では配列番号2に示すアミノ酸を含み、このN末端お

よびC末端に複数のアミノ酸が付加した配列番号3に示す配列を有するペプチドを遺伝子組換え法により製造したが、このペプチドにも以下の実施例に示すように細胞接着活性が確認された。

【0012】本発明のペプチドは、それ自身が細胞接着活性を有することにより種々の生物学的機能を果たすのみでなく、その細胞接着活性のために、メラノーマなどの細胞接着活性を介して転移すると考えられている腫瘍細胞の細胞接着と競合する結果、該腫瘍の転移を阻害するなどの間接的な生物学的作用をも有する。したがって、本発明にいう細胞接着活性には上記両方の意味を含む。

【0013】本発明のペプチドが含まれるpp-vWFと、正常組織および腫瘍組織由来の細胞株14種との接着性を検討したところ、pp-vWFはこれらの細胞のうち、メラノーマ由来の細胞(B16、G-361)とのみ顕著に接着した。また、RGD配列を含むペプチドGRGDSP(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro)が成熟vWFの接着を阻害したのに対し、同ペプチドはpp-vWFの接着に影響を与えなかった。したがって、pp-vWFへの接着は、成熟vWFへの接着に用いられるビトロネクチンレセプター( $\alpha$ V $\beta$ 3)のようなRGD依存性インテグリンを介するものではなく、RGD非依存性インテグリンまたは非インテグリンタイプのレセプターを介しているものと推定される。

【0014】さらに、B16細胞のpp-vWFへの接着活性は $Mg^{2+}$ の濃度に依存して増加し、また $Mg^{2+}$ 存在下でのB16のpp-vWFへの接着は、 $Ca^{2+}$ の添加により濃度依存的に阻害された。この $Mg^{2+}$ 依存性かつ $Ca^{2+}$ 阻害可能な接着活性は、コラーゲンに対する $\alpha 2 \beta 1$ 媒介性接着などの $\beta 1$ インテグリン媒介性接着と極めてよく似ている。そこでヒトメラノーマ細胞を用いてpp-vWFへの接着に対する抗インテグリンモノクローナル抗体の影響を試験したところ、抗 $\beta 1$ 抗体(4B4)の存在下でG-361細胞のpp-vWFへの接着は完全に阻害されたこと、また抗 $\alpha 2$ 抗体(6F1)はpp-vWFの接着に何ら影響を与えなかったことから、pp-vWFのレセプターは $\alpha 2 \beta 1$ ではなく、他の $\beta 1$ インテグリンであることが示された。

【0015】pp-vWFに対する各種モノクローナル抗体を用いて、ウシpp-vWFとB16細胞との接着活性の影響を調べた試験から、pp-vWFのSer376から始まる8kDa断片にpp-vWFの接着部位があることが示唆された。

【0016】本発明者らは次いで8kDa断片をウシpp-vWFから単離し、その接着活性を直接検討した。その結果、8kDa断片が濃度依存的にB16細胞の接着を促進することが確かめられた。

【0017】本発明者らはさらに、該8kDa断片領域を含むペプチドを組換えDNA法によって大腸菌で発現させ、得られたペプチドの細胞接着活性を試験したところ、この組換えペプチドはpp-vWFと同様にヒトメラノーマ細胞(G-361)に対する細胞接着活性を示した。

【0018】以上のことから、本発明の細胞接着活性ペプチドがpp-vWF中の細胞接着ドメインを構成し、従来公知のRGDペプチドなどとは異なる新規な細胞接着活性ペプチドであることが明らかとなった。

【0019】本発明のペプチドを製造するには、実施例9で記載するように、牛pp-vWFを酵素消化したものを逆相高性能液体クロマトグラフィーなどにより分離精製して得ることができる。

【0020】また、本発明のペプチドは、配列表の配列番号2に示す配列にしたがって、固相法、フラグメント凝縮または古典的溶液合成法によって合成することができる。好ましくは、固相ペプチド合成法(Atherton et al., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1989)を用いて段階的に合成する。固相合成法は通常、 $\alpha$ アミノ基が保護された(側鎖が保護された)アミノ酸を適当な固体支持体に結合させることによってカルボキシル基末端から実施される。

【0021】さらに、組換えDNA法によって本発明のペプチドを製造することもできる。一般的手法については例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照されたい。本発明者らは、本発明ペプチドのアミノ酸配列の情報をもとにプライマーを合成し、PCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)法を用いてpp-vWFの8kDa領域を含むcDNAを増幅した。

【0022】このようにして得られたcDNAを適当なベクター中に組み込むことによって、原核細胞(大腸菌、バシルス・ズブチリス、バシルス・サーモフィルスなど)または真核細胞(真核微生物としてはサッカロミセス・セレビシエなど、哺乳動物由来のものとしてはCOS細胞、CHO細胞、C127細胞、3T3細胞、Hela細胞、BHK細胞など)の宿主細胞を形質転換させることができる。

【0023】さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現に係わる配列を導入することによって、それぞれの宿主において遺伝子を発現することが可能である。

【0024】以上のようにして目的とする細胞接着活性ペプチドをコードする遺伝子で形質転換した形質転換体

を培養し、産生した細胞接着活性ペプチドを細胞内または細胞外から分離し均一にまで精製することができる。

【0025】なお、本発明の細胞接着活性ペプチドの分離、精製は、通常のペプチドで用いられる分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、各種クロマトグラフィー、限外濾過、透析、塩析などを適宜選択、組み合わせて使用することができる。

【0026】細胞接着分子は、細胞の形態調節、増殖、分化、および細胞の移動などにおおいに関与しており、また癌転移に関与することが示されている。細胞上の接着分子は接着を通じて細胞内へに情報伝達を行うことで細胞機能を調節し、転移のカスケードに関与していると考えられている。フィブロネクチン由来の合成GRGDSペプチドをマウスのメラノーマ細胞と同時にメラノーマの静脈内に投与することにより肺への転移が阻害されたことが報告されている(Humphries, M. et al., Science 233:467, 1986)。したがって、本発明の細胞接着活性ペプチドは上記細胞の形態調節、増殖、分化などの過程を調節する薬剤として、また癌の転移抑制剤としての医薬用途に利用できる可能性を有している。

【0027】なお、参考のため、pp-vWFおよび成熟vWFを含むプレプロ-vWFの構造模式図を図10に示す。また、ヒトpp-vWFのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示し、本発明の細胞接着活性ペプチド部分を下線で示す。

【0028】以下の実施例において本願発明をさらに詳しく説明するが、本願発明はこれら実施例の記載によって限定されるものではない。

#### 【0029】

##### 【実施例】

実施例1：使用材料および細胞培養、細胞アッセイ法  
使用材料

pp-vWFは先に報告されたイムノアフィニティークロマトグラフィー(Usui, T. et al., Eur. J. Biochem. 205:363-367, 1992)により牛血小板から精製した。

【0030】vWFは文献記載の方法(Kirby, E. P., J. Lab. Clin. Med. 100:963-976, 1982)に準じ新鮮な牛血漿から精製した。

【0031】牛血漿フィブロネクチンは伊藤ハム食品(株)から供給を受けた。マウスラミニン、抗マウスラミニンポリクローナル抗体、およびペプチド：GRGDS P、GRGES Pは岩城ガラスより購入した。牛pp-vWFに対するポリクローナル抗体、成熟vWFは本発明者らの研究室で調製した(Takagi, J. et al., J. Biol. Chem. 264:10425-10430, 1989)。

【0032】牛pp-vWFに対するモノクローナル抗

体(クローンTC1、TC2、TC4、TC6、TC7、およびTC8)の作成および性状の確認は文献記載の方法(Fujisawa, T. et al., Eur. J. Biochem. 196:673-677, 1991)により行った。抗-インテグリンモノクローナル抗体4B4(抗-ヒト $\beta$ 1サブユニット)および6F1(抗-ヒト $\alpha$ 2サブユニット)はC. Morimoto博士(Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA)およびB. S. Coller博士(State University of New York, Stony Brook, NY)からそれぞれ恵与された。

#### 細胞培養

牛大動脈内皮細胞は牛大動脈から分離し、10%牛胎児血清(FBS)を含むEagle's minimum essential medium(MEM)にて培養した(Hagiwara, H. et al., Thrombos. Res. 33:363-370, 1984)。他の細胞株は財団法人がん研究振興財団の細胞バンク(東京)から入手し、10% FBSを含むMEMまたは10% FBSを含むRPMI 1640で培養した。細胞はコンフルエント近くまで培養しリン酸緩衝液(pH 7.4:2.5mM EDTA、2mg/ml牛血清アルブミンを含む)で37℃にて30分間インキュベートした。その後、細胞は3回洗浄し血清を含まないMEM培地に懸濁して接着アッセイを行った。

#### 細胞接着アッセイ

細胞接着アッセイは以下のように行った。即ち、試料の蛋白質は20 $\mu$ g/mlの濃度に10mM Tris-HCl、150mM NaCl、pH 7.4(Tris/NaCl)で調整し6mm角プラスチックプレートに4℃にて16時間吸着させた。1% BSAを含むTris/NaClを室温で1時間処理し、非特異的なタンパク質の結合をブロックした。プレートを48-ウエル培養ディッシュ(コースター3548)に置き2 $\times$ 10<sup>5</sup>個/0.3ml MEMの細胞を蒔いた。37℃で90分インキュベーションした後、プレートをつまみ上げ冷却したPBS(Phosphate-buffered saline)にて非接着細胞を除き1%グルタルアルデヒドで固定した。次いで20%メタノールに溶解した0.5%クリスタルバイオレットで染色した。接着細胞は顕微鏡にて細胞数を計測した。

【0033】実施例2:各種タンパク質へのウシ大動脈血管内皮細胞およびB16メラノーマ細胞の接着性

20 $\mu$ g/mlのBSA(ウシ血清アルブミン)、pp-vWF、vWFまたはフィブロネクチン各40 $\mu$ lを6mm角のプラスチックプレートにのせて4℃で一晩静置し、BSA、pp-vWF、vWFまたはフィブロネクチンをプレートに吸着させた後、余分な溶液を除去した。さらに、非特異的なタンパク吸着をブロックする

目的で、このプレートに1%のウシ血清アルブミンをのせ、室温で1時間以上静置し、余分な溶液を除去した。このようにして調製したBSAコーティングプレート、pp-vWFコーティングプレート、vWFコーティングプレートまたはフィブロネクチンコーティングプレートを48ウエル細胞培養用ディッシュ(コースター社製)の底に置き、MEMに懸濁したウシ動脈血管内皮細胞(BAEC:2 $\times$ 10<sup>5</sup>個/ml)0.3mlまたはB16メラノーマ細胞(2 $\times$ 10<sup>5</sup>個/ml)0.3mlを各ウエルに添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で90分保温した。これらのプレートをPBSで洗浄した後、1%グルタルアルデヒドで5分間固定した。さらに0.5%クリスタルバイオレット・20%メタノール中にこのプレートを浸すことにより、細胞を染色しPBSで洗浄した。

【0034】得られた結果を図1に示す。図1から明らかなように、ウシ動脈血管内皮細胞(BAEC)がvWFおよびフィブロネクチンと強く接着したのに比較して、pp-vWFおよびBSAとの接着はあまり顕著ではなかった。成熟vWFがRGD依存的に内皮細胞と接着することはよく知られたことである。一方、B16メラノーマ細胞との接着を試験したところ、牛pp-vWFをコートしたプラスチック表面上にB16細胞は接着して伸展しており、pp-vWFが細胞接着を促進することが確認された。これらの転移性の高いB16細胞は以前に報告されたように牛フィブロネクチンともよく接着した。フィブロネクチンに接着した細胞は細胞が扁平であることが観察され、これは細胞表面の大きな面積がタンパク質と接触していることを示唆する。これとは対照的に、pp-vWFに接着した細胞は伸長し、いくつかの細胞は広がらずに接着していた。pp-vWFに接着した細胞の数はフィブロネクチンに接着した細胞数よりも少なく、pp-vWFでは接着した細胞数は蒔いた細胞数のおよそ60%であったが、フィブロネクチンでは蒔いた細胞のほとんど全てが接着した。しかしながら、成熟vWFに対する細胞接着の程度はpp-vWFよりもはるかに低く、広がりも少ないことが明らかになった。

【0035】実施例3:各種タンパク質へのB16細胞の接着に対する抗体の効果

B16細胞とpp-vWFとの相互作用を検討するために、各種タンパク質に対する特異的ポリクローナル抗体の存在下に接着性を試験した。

【0036】各種接着タンパク質でコーティングしたプラスチックプレートを、各種接着タンパク質に対するポリクローナル抗体(100 $\mu$ g/ml)で37℃で30分間プレインキュベーションした後、細胞懸濁液を添加した。pp-vWF、vWFおよびラミニンに対する抗体は固定化抗原上を用いたクロマトグラフィーにより精製した特異的抗体であり、抗フィブロネクチン抗体は

抗血清から得たIgG分画であった。接着した1mm<sup>2</sup>当たりの細胞数を計数して、平均±SEで表した。得られた結果を以下の表1に示す。なお、NTは測定してい

ないことを示す。  
【0037】

表1

各種タンパク質へのB16細胞の接着に対する抗体の効果

抗体	各種タンパク質への接着細胞数(細胞/mm <sup>2</sup> )			
	pp-vWF	vWF	フィブロネクチン	ラミニン
対照IgG	713 ± 193	348 ± 21	1193 ± 204	1047 ± 87
抗pp-vWF抗体	11 ± 4	NT	NT	NT
抗vWF抗体	504 ± 32	27 ± 24	NT	NT
抗フィブロネクチン	722 ± 71	NT	408 ± 32	NT
抗体				
抗ラミニン抗体	535 ± 30	NT	NT	43 ± 6

表1から明らかなように、抗pp-vWF抗体はpp-vWFに対する接着を完全に阻害した。一方、フィブロネクチン、ラミニン、vWFに対する抗体はpp-vWFに対する接着をほとんど阻害しなかったが、それぞれの抗原に対するB16細胞の接着については効果的であった。これらの結果から、pp-vWFを介する細胞接着は非常に特異的で他の接着タンパク質の混在の結果で

20 はないことが示された。

【0038】実施例4：pp-vWFと接着する細胞他の各種細胞とpp-vWF、vWFおよびフィブロネクチンとの接着性をさらに検討した。正常組織と腫瘍組織の両方の細胞株14種について検討した。得られた結果を以下の表2に示す。



表 2

pp-vWFと接着する細胞

細胞 (種)	コーティングしたタンパク質		
	pp-vWF	vWF	フィブロネクチン
<b>メラノーマ</b>			
B16 (マウス)	+	+	+
G-361 (ヒト)	+	-	+
<b>繊維肉腫</b>			
HT-1080 (ヒト)	-	+	+
<b>カルシノーマ</b>			
HeLa (ヒト)	-	+	+
A-431 (ヒト)	-	+	+
<b>神経芽細胞腫</b>			
IMR-32 (ヒト)	-	-	+
GOTO (ヒト)	-	-	+
<b>骨髓細胞</b>			
U937 (ヒト)	± <sup>a</sup>	-	+
HL60 (ヒト)	-	-	+
K562 (ヒト)	-	-	+
<b>神経芽細胞</b>			
NRK (ラット)	-	-	+
TIG-1 (ヒト)	-	-	+
<b>その他</b>			
BAEC (ウシ)	-	+	+
PC12 (ラット)	-	-	+

a : 接着細胞数がBSA対照の接着数の10倍よりも多い場合には接着活性を陽性と判断して+で表す。

b : pp-vWFに対するU937の接着はあいまいであった。比較的若い世代の細胞では時々接着が観察されたが、培養期間が長くなるにつれて接着活性が消えるように思われた。

【0039】 pp-vWFが接着活性を示した2つの細胞株はメラノーマ由来であり、pp-vWFはカルシノーマ、肉腫、神経芽細胞腫、白血病などの腫瘍細胞や正常細胞に対しては接着活性を示さなかった。一方、成熟vWFの細胞認識の特異性はpp-vWFとは全く異なる。例えば、G-361細胞はpp-vWFとは接着したが、成熟vWFに対しては有意に接着しなかった。またHT-1080細胞は成熟vWFとはかなり接着したが、pp-vWFとは全く接着しなかった。試験したすべての細胞はフィブロネクチンに対するレセプターをもち、フィブロネクチンが各種細胞に共通の接着タンパク質であることを示す。pp-vWFに対する特異的レセプターは明らかにB16細胞やG-361細胞などの特定細胞系でのみ発現している。

【0040】 実施例5 : pp-vWFのレセプター分子の検討

20  $\mu$ g/mlのpp-vWFまたはvWF各40  $\mu$ lを6mm角のプラスチックプレートにのせて4℃で一晩静置し、pp-vWFまたはvWFをプレートに吸着させた後、余分な溶液を除去した。さらに、非特異的なタンパク吸着をブロックする目的で、このプレートに1%のウシ血清アルブミンをのせ、室温で1時間以上静置し、余分な溶液を除去した。このようにして調製したpp-vWFコーティングプレートまたはvWFコーティングプレートを48ウエル細胞培養用ディッシュ(コースター社製)の底に置き、MEMに懸濁したB16細胞( $2 \times 10^5$  個/ml) 0.3mlまたは1mM RGD配列を含むGRGDSPペプチド(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro、岩城ガラス社製)を含むMEMに懸濁したB16細胞( $2 \times 10^5$  個/ml) 0.3mlを各ウエルに添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で90分保温した。これらのプレート

13

をPBSで洗浄した後、1%グルタルアルデヒドで5分間固定した。さらに0.5%クリスタルバイオレット・20%メタノール中にこのプレートを浸すことにより、細胞を染色しPBSで洗浄した。

【0041】得られた結果を図2に示す。図2から明らかなように、GRGDSPペプチドはウシ成熟vWFへの接着および伸展を完全に阻害した。これとは対照的に、pp-vWFの接着と伸展は1mM GRGDSPの存在下においても全く影響を受けなかった。

【0042】実施例6：B16細胞のpp-vWFへの接着性の $Mg^{2+}$ および $Ca^{2+}$ 依存性 B16細胞のpp-vWFへの接着性の $Mg^{2+}$ 依存性を試験するために以下の実験を行った。

【0043】20 $\mu$ g/mlのpp-vWF40 $\mu$ lを6mm角のプラスチックプレートにのせて4℃で一晩静置し、pp-vWFをプレートに吸着させた後、余分な溶液を除去した。さらに、非特異的なタンパク吸着をブロックする目的で、このプレートに1%のウシ血清アルブミンをのせ、室温で1時間以上静置し、余分な溶液を除去した。このようにして調製したpp-vWFコーティングプレートを48ウェル細胞培養用ディッシュ（コースター社製）の底に置き、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0および16mMの $MgCl_2$ を含むそれぞれのトリス緩衝液に懸濁したB16細胞（ $2 \times 10^5$ 個/ml）0.3mlを各ウェルに添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で90分保温した。これらのプレートをPBSで洗浄した後、1%グルタルアルデヒドで5分間固定した。さらに0.5%クリスタルバイオレット・20%メタノール中にこのプレートを浸すことにより、細胞を染色しPBSで洗浄した後、プレート上に接着した1mm<sup>2</sup>当たりの細胞数を計数した。

【0044】得られた結果を図3：aに示す。図3：aから明らかなように、B16細胞のpp-vWFへの接着は $Mg^{2+}$ の濃度に完全に依存しており、1mM以上の $Mg^{2+}$ がこの接着活性には必要であり、10mM以上の $Mg^{2+}$ 存在下ではその細胞接着活性は一定となった。

【0045】次いで $Mg^{2+}$ の存在下における $Ca^{2+}$ の影響を試験するために以下の実験を行った。

【0046】20 $\mu$ g/mlのpp-vWF40 $\mu$ lを6mm角のプラスチックプレートにのせて4℃で一晩静置し、pp-vWFをプレートに吸着させた後、余分な溶液を除去した。さらに、非特異的なタンパク吸着をブロックする目的で、このプレートに1%のウシ血清アルブミンをのせ、室温で1時間以上静置し、余分な溶液を除去した。このようにして調製したpp-vWFコーティングプレートを48ウェル細胞培養用ディッシュ（コースター社製）の底に置き、5.0mMの $MgCl_2$ および0、0.01、0.02、0.1、0.2、1.0および2.0mMの $CaCl_2$ を含むそれぞれのトリス

14

緩衝液に懸濁したB16細胞（ $2 \times 10^5$ 個/ml）0.3mlを各ウェルに添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で90分保温した。これらのプレートをPBSで洗浄した後、1%グルタルアルデヒドで5分間固定した。さらに0.5%クリスタルバイオレット・20%メタノール中にこのプレートを浸すことにより、細胞を染色しPBSで洗浄した後、プレート上に接着した1mm<sup>2</sup>当たりの細胞数を計数し、 $CaCl_2$ 無添加での接着細胞数に対する比率を求めた。

【0047】得られた結果を図3：bに示す。図3：bから明らかなように、 $Mg^{2+}$ 存在下でのB16細胞のpp-vWFへの接着は、 $Ca^{2+}$ の添加により濃度依存的に阻害され、1mMの $Ca^{2+}$ 添加により約70%の接着活性が阻害された。

【0048】実施例7：pp-vWFへの接着に対する抗インテグリン抗体の影響

20 $\mu$ g/mlのpp-vWF、フィブロネクチンまたはI型コラーゲン各40 $\mu$ lを6mm角のプラスチックプレートにのせて4℃で一晩静置し、pp-vWF、フィブロネクチンまたはI型コラーゲンをプレートに吸着させた後、余分な溶液を除去した。さらに、非特異的なタンパク吸着をブロックする目的で、このプレートに1%のウシ血清アルブミンをのせ、室温で1時間以上静置し、余分な溶液を除去した。このようにして調製したpp-vWFコーティングプレート、フィブロネクチンコーティングプレートまたはI型コラーゲンコーティングプレートを48ウェル細胞培養用ディッシュ（コースター社製）の底に置いた。それぞれのタンパク質をコートしたプレートに各抗体（KK2：対照、6F1：抗 $\alpha 2$ インテグリン抗体、4B4：抗 $\beta 1$ インテグリン抗体）20 $\mu$ g/mlを加えたMEMに懸濁したヒトメラノーマ由来G-361細胞液（ $2 \times 10^5$ 個/ml）0.3mlを各ウェルに添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で9分保温した。これらのプレートをPBSで洗浄した後、1%グルタルアルデヒドで5分間固定した。さらに0.5%クリスタルバイオレット・20%メタノール中にこのプレートを浸すことにより、細胞を染色しPBSで洗浄した後、プレート上に接着した1mm<sup>2</sup>当たりの細胞数を計数した。各抗体の存在下でのpp-vWF、フィブロネクチン、I型コラーゲンへの接着細胞数を、対照抗体KK2存在下でのpp-vWF、フィブロネクチン、I型コラーゲンへの接着細胞数に対する比率で示した。

【0049】得られた結果を図4に示す。図4から明らかなように、抗 $\beta 1$ インテグリン抗体（4B4）の存在下では、pp-vWFへのG-361細胞の接着は完全にブロックされ、このことからG-361細胞がpp-vWFのレセプターとしてインテグリンの $\beta 1$ クラスを用いていることが示された。一方、フィブロネクチンとI型コラーゲンはこの抗体によって部分的にブロックさ

れたのみであったので、異なるレセプターの関与が示唆された。

【0050】これとは対照的に抗 $\alpha 2$ 抗体(6F1)はpp-vWFの接着に何ら影響を与えなかったが、I型コラーゲンへの $\beta 1$ インテグリン媒介性接着の約50%を阻害した。これより、pp-vWFのレセプターは $\alpha 2\beta 1$ ではなく、他の $\beta 1$ インテグリンであることが強く示唆された。

【0051】実施例8:モノクローナル抗体との反応性細胞接着活性に関与するpp-vWF中の構造ドメインを推定するために、B16細胞上でのウシpp-vWFに対するモノクローナル抗体の効果を試験した。

【0052】 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のpp-vWF各 $40\mu\text{l}$ を6mm角のプラスチックプレートにのせて4℃で一晩静置し、pp-vWFをプレートに吸着させた後、余分な溶液を除去した。さらに、非特異的なタンパク吸着をブロックする目的で、このプレートに1%のウシ血清アルブミンをのせ、室温で1時間以上静置し、余分な溶液を除去した。このようにして調製したpp-vWFコーティングプレートを48ウェル細胞培養用ディッシュ(コースター社製)の底に置いた。 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の各モノクローナル抗体(TC1、TC2、TC4、TC6、TC7およびTC8)のMEM溶液、ならびに抗体KK2のMEM溶液を、 $0.1\text{ml}$ ずつpp-vWFコーティングプレートに添加し、37℃で30分保温した。MEMに懸濁したB16細胞液( $3\times 10^5$ 個/ $\text{ml}$ ) $0.2\text{ml}$ を各ウェルに添加し、 $\text{CO}_2$ インキュベーター中、37℃で90分保温した。これらのプレートをPBSで洗浄した後、1%グルタルアルデヒドで5分間固定した。さらに、0.5%クリスタルバイオレット・20%メタノール中にこのプレートを浸すことにより、細胞を染色しPBSで洗浄した後、プレート上に接着した $1\text{mm}^2$ 当たりの細胞数を計数した。各抗体でブレインキュベーションした後のpp-vWFへの接着細胞数を、抗体無添加での接着数に対する比率で示した。

【0053】得られた結果を図5に示す。TC2、TC6、TC7およびTC8抗体はもともとI型コラーゲンへのpp-vWFの結合を阻害するモノクローナル抗体(Fujisawa, T. et al., Eur. J. Biochem. 196:673-677, 1991)として選択された。図5から明らかなように、これらの抗体はB16細胞のpp-vWFへの接着に対して中程度の阻害効果を示し、その阻害率は50%以下であった。また、コラーゲンへのpp-vWFの結合を阻害しないTC1抗体はごく限られた阻害を示したのみであった。これらとは対照的に、コラーゲン結合活性を阻害しないTC4抗体はpp-vWFへの接着を完全に阻害した。

【0054】本発明者らは、あらかじめpp-vWFのタンパク質分解断片を用いてこれらのモノクローナル抗

体のエピトープの位置を決定していた(Fujisawa, T. et al., Eur. J. Biochem. 196:673-677, 1991)。TC4はpp-vWF分子の中央領域に由来する8kDaの断片と反応し、TC2およびTC8はC末端付近の21kDa断片を認識し、またTC6およびTC7は最初のCysに富む領域からの18kDa断片を認識した。TC1のエピトープは決定されていない。TC4による特異的阻害は、pp-vWFの細胞接着部位がTC4のエピトープのごく近くで、Ser376から始まる8kDa断片にあることを強く示唆する。

【0055】実施例9:牛pp-vWFの8kDa断片の調製

実施例1に示した方法で精製した牛pp-vWFを5M尿素、5mM EDTAを含む0.5Mトリス緩衝液、pH8.6に溶解し脱気した後、 $0.12\text{mmol}$ の $\beta$ -メルカプトエタノール(和光純薬社製)を添加し、40℃で2時間保温する。その後、 $0.12\text{mmol}$ のモノヨードアセトアミド(和光純薬社製)を添加し、さらに40℃で2時間反応させる。この反応液よりゲル濾過(Sephadex G-25 (Pharmacia社製))により余分な低分子物質を除去した後凍結乾燥し、還元アルキル化pp-vWFを調製した。

【0056】4mgの還元アルキル化pp-vWFを4M尿素を含む10mMトリス緩衝液、pH9.0、 $2\text{ml}$ に溶解した後、 $7.5\mu\text{g}$ のlysyl Endopeptidase(和光純薬社製)を添加し30℃で7時間消化した。この消化反応液を直接逆相HPLCにかけて、数種の断片を分離分取した。この分取には、Biofine RPC-SC18カラム( $0.46\times 25\text{cm}$ ; 日本分光社製)を用い、0.1%トリフルオロ酢酸中アセトニトリルの濃度勾配により溶出した。

【0057】分取した数種の断片の内、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量8kDaを示す断片は、実施例8で用いたモノクローナル抗体TC4のみに反応した。さらに、この8kDa断片のアミノ酸配列を気相法によるペプチドシーケンサー(Applied Biosystems社製、model 477A)でN末端より26残基分析した結果、S-F-D-D-R-H-F-T-S-G-V-C-Q-Y-L-L-A-Q-D-C-Q-D-H-S-Fであることが判明した。この配列はMancuso, D. J. らによって開示されている(J. B. C., 264:19514-19527, 1989)ヒトvWFゲノムのDNA配列より決定されたvWF前駆体中pp-vWFのSer(376)から始まる配列と極めて高いホモロジーを示した。また、この断片はlysyl Endopeptidaseによる完全消化により得られたものであり、C末端はLys(435)である。以上より、牛8kDa断片はヒトpp-vWFのSer(376)-Lys

(435)に相当するペプチドであると結論した。

【0058】実施例10: 8kDa断片の細胞接着活性  
実施例9で得たpp-vWFから単離した8kDa断片を用いてB16細胞への細胞接着活性を試験した。

【0059】1. 5、5. 0、15および50 $\mu$ g/mlのpp-vWF 8kDa断片40 $\mu$ lを6mm角のプラスチックプレートにのせて4℃で一晩静置し、pp-vWFをプレートに吸着させた後、余分な溶液を除去した。さらに、非特異的なタンパク吸着をブロックする目的で、このプレートに1%のウシ血清アルブミンをのせ、室温で1時間以上静置し、余分な溶液を除去した。このようにして調製したpp-vWF 8kDa断片コーティングプレートを48ウェル細胞培養用ディッシュ(コースター社製)の底に置き、MEMに懸濁したB16細胞液(2 $\times$ 10<sup>5</sup>個/ml)0.3mlを各ウェルに添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で90分保温した。これらのプレートをPBSで洗浄した後、1%グルタルアルデヒドで5分間固定した。さらに0.5%クリスタルバイオレット・20%メタノール中にこのプレートを浸すことにより、細胞を染色しPBSで洗浄した後、プレート上に接着した1mm<sup>2</sup>当たりの細胞数を計数した。

【0060】得られた結果を図6に示す。図6から明らかなように、8kDa断片はB16メラノーマ細胞の接着を顕著に促進した。接着の程度はコーティング段階で使用した断片の濃度に依存して増加して最大レベルに達するが、このレベルはpp-vWF自体を用いて試験したときに得られたレベルと同等であった。

【0061】実施例11: pp-vWFの8kDa領域を含むペプチドの大腸菌での発現  
ヒト胎盤より調製したPoly(A)<sup>+</sup>RNA(CLO NTECH社製)に、常法により合成したDNAオリゴマー2種類(プライマー8KAE: 5'-GAATTC TTTTCAGGAGGGGGAGCTGGA; プライマー8K1E: 5'-GAATTCACCTTCAAGAG CTTTGACAAC)を添加し、Wang, A. M. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9717-9721, 1989)らによって開示されているRT-PCR法により、pp-vWF遺伝子配列(Mancuso, D. J. et al., J. B. C. 264: 19514-19527, 1989)中のエクソン11からエクソン12にわたる8kDa領域を含む遺伝子配列を増幅した。

【0062】この8kDa領域を含む遺伝子配列に相当するcDNAをプラスミドベクターpBluescript II (STRATAGENE社製)に組み込み、大腸菌に形質転換してクローニングした。このプラスミドベクターを分離した後、そのDNA配列をA. L. F. DNAシーケンサー(Pharmacia社製)により確認した。この8kDa領域を含む遺伝子配列を

制限酵素EcoRI(東洋紡社製)により切り出し、得られたDNA断片を市販の発現ベクターpGEX-2T(Pharmacia社製)に組み込み、大腸菌JM109(東洋紡社製)に形質転換した(図7)。

【0063】この大腸菌を培養し常法(Molecular cloning, Sambrook, J. et al. Eds. Cold Spring Harbor Press)に従ってIPTG(イソプロピル-1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)により、pp-vWFの8kDa領域を含みエクソン11からエクソン12までにコードされている部分(His(373)-Lys(455))をGST(グルタチオンS-トランスフェラーゼ)との融合タンパク質として発現誘導した。

【0064】大腸菌を凍結融解した後、超音波破碎し、この融合タンパク質を含む画分を分離し、さらに8M尿素を含むトリス緩衝液で平衡化したゲル濾過用カラム(Sephacryl S-200HR(2.6 $\times$ 66cm)、Pharmacia社製)により分画した。この画分をウシトロンビン(Sigma社製)で消化した後、再び同カラムを用いたゲル濾過により求めるペプチドを含む画分を得た。さらに、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(TSKgel DEAE-5PW(7.5 $\times$ 75mm)、東ソー社製)を用いてペプチドを単離した。

【0065】このペプチドはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約10kDaを示した。また、このペプチドのアミノ酸配列を固相エドマン法を用いたプロテインシーケンサーModel 6625(Milligen社製)でN末端から30残基分析した結果、X-S-P-G-I-H-F-K-S-F-D-N-R-Y-F-T-F-S-G-I-X-Q-Y-L-L-A-R-D-X-Qの配列であることが判明した。上記配列のうち、N末端からの5残基は融合タンパク質のトロンビン切断部位のC末端側由来の配列と一致し、下線部以降は本来のpp-vWFと、特に9残基以降は本明細書の8kDaペプチド(Ser(376)-Lys(435))のN末端側の配列と完全に一致した。

【0066】以上の結果から、本ペプチドは、8kDaペプチドを含む配列表の配列番号3に示す配列を有するペプチドであり、これをrec 8kとした。

【0067】実施例12: 発現ペプチドの細胞接着性  
実施例11で得られた発現ペプチドrec 8kのメラノーマ細胞への細胞接着性をpp-vWFと比較して試験した。

【0068】20 $\mu$ g/mlのpp-vWFまたはrec 8k各40 $\mu$ lを6mm角のプラスチックプレートにのせて4℃で一晩静置し、pp-vWFまたはrec 8kをプレートに吸着させた後、余分な溶液を除去した。さらに、非特異的なタンパク吸着をブロックする目的で、このプレートに1%のウシ血清アルブミンをの

せ、室温で1時間以上静置し、余分な溶液を除去した。このようにして調製したpp-vWFコーティングプレートまたはrec 8kコーティングプレートを48ウェル細胞培養用ディッシュ（コースター社製）の底に置き、MEMに懸濁したG-361細胞（ $2 \times 10^5$  個/ml）0.3mlを各ウェルに添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で90分保温した。これらのプレートをPBSで洗浄した後、1%グルタルアルデヒドで5分間固定した。さらに0.5%クリスタルバイオレット・20%メタノール中にこのプレートを浸すことにより、細胞を染色しPBSで洗浄した。

【0069】得られた結果を図8に示す。大腸菌で発現させたpp-vWFの8kDa領域を含むペプチドであるrec 8kは、pp-vWFと同様にメラノーマ細胞に対して細胞接着活性を示した。

【0070】実施例13：発現ペプチドの細胞接着性に対するRGE、RGD、ヘパリンおよび抗β1インテグリン抗体の効果

実施例11で得られた発現ペプチドrec 8kの細胞接着性に対するRGE、RGD、ヘパリンおよび抗β1インテグリン抗体（4B4）の効果を、pp-vWFと比較して試験した。

【0071】20μg/mlのpp-vWFまたはrec 8k各40μlを6mm角のプラスチックプレートにのせて4℃で一晩静置し、pp-vWFまたはrec 8kをプレートに吸着させた後、余分な溶液を除去した。さらに、非特異的なタンパク吸着をブロックする目的で、このプレートに1%のウシ血清アルブミンをのせ、室温で1時間以上静置し、余分な溶液を除去した。このようにして調製したpp-vWFコーティングプレートまたはrec 8kコーティングプレートを48ウェル細胞培養用ディッシュ（コースター社製）の底に置き、RGEペプチド（Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Pro, 0.5mM）、RGDペプチド（Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro, 0.5mM）、4B4（抗β1インテグリン抗体、10μg/ml）またはヘパリン（100μg/ml）を添加したMEMに懸濁したヒトメラノーマ由来G-361細胞液（ $2 \times 10^5$  個/ml）0.3mlを各ウェルに添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で90分保温した。これらのプレートをPBSで洗浄した後、1%グルタルアルデヒドで5分間固定した。さらに0.5%クリスタルバイオレット・20%メタノール中にこのプレートを浸すことにより、細胞を染色しPBSで洗浄した後、プレート上に接着した1mm<sup>2</sup> 当たりの細胞数を計数した。

【0072】得られた結果を図9に示す。図9から明らかなように、大腸菌で発現させたpp-vWFの8kDa

a領域を含むペプチドrec 8kとメラノーマ細胞との接着は、RGD、RGEペプチドあるいはヘパリンで阻害されないが、4B4（抗β1インテグリン抗体）で完全に阻害された。これは、pp-vWFとメラノーマとの接着と全く同じ結果であり、8kDa領域にpp-vWFのもつ細胞接着配列が含まれていることを支持する。

#### 【0073】

【発明の効果】本発明の細胞接着活性ペプチドは特にメラノーマ細胞に対する特異的な細胞接着活性を示し、癌転移の抑制などの医薬用途に応用しうる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】ウシ動脈血管内皮細胞およびB16メラノーマ細胞への各種タンパク質の接着性を示す図（生物の形態を示す写真）である。

【図2】成熟vWFおよびpp-vWFへのB16細胞の接着に与えるRGDペプチドの効果を示す図（生物の形態を示す写真）である。

【図3】pp-vWFへのB16細胞の接着に与えるMg<sup>2+</sup>の効果（a）およびMg<sup>2+</sup>存在下でのCa<sup>2+</sup>の効果（b）を示す図である。

【図4】pp-vWF、フィブロネクチンおよびコラーゲンへのG-361細胞の接着に与える抗インテグリンモノクローナル抗体の効果を示す図である。

【図5】pp-vWFへのB16細胞の接着に与える、pp-vWFに対するモノクローナル抗体の効果を示す図である。

【図6】ウシpp-vWF由来の8kDa断片へのB16細胞の接着を示す図である。

【図7】pp-vWFの8kDa領域を含むペプチド（rec 8k）を大腸菌で発現させるための発現ベクターの構築を示す図である。

【図8】pp-vWFおよびrec 8kのメラノーマ細胞（G-361細胞）への接着性を示す図（生物の形態を示す写真）である。

【図9】pp-vWFおよびrec 8kのG-361細胞への接着に与えるRGE、RGD、4B4およびヘパリンの効果を示す図である。

【図10】pp-vWFおよび成熟vWFを含むプレプロvWFの構造模式図である。

#### 【配列表】配列番号：1

配列の長さ：741

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

21

22

```

1 AEGTRGRSST ARC3LFGSDF VNTPDGSMYS FAGYCSYLLA GGCQKRSFSI 30
51 IGDFQNGKRV SLSVYLGEFF DIHLFVNGTV TQGDQRVSMF YASKGLYLET 100
101 EAGYYKLSGE AYGFVARIDG SGNFQVLLSD RYFNKTCGLC GNFNIPAEED 150
151 FMTQEGTLTS DPYDFANSWA LSSGEQWCER ASPPSSSCNI SSGEMQKGLW 200
201 EQCQLLKSTS VFARCHPLVD PEPFVALCEK TLCECAGGLE CACPALLEYA 250
251 RTCAQECMYL YGWTDSACS PVCAPAGMEYR QCVSPCARTC QSLHINEMCO 300
301 ERCVDGCSCP EGQLLDEGLC VESTECPCVH SGKRYPPGTS LSRDCNTCIC 350
351 RNSQWICSNE ECPGECLVTG QSHPKSFDNR YFTFSGICQY LLARDQDHS 400
401 PSIVIVETVQC ADDRDAVCTR SVTVRLPGLH NSLVKLKHGA 450
      8 kDa
      GVAMDGQDIQ 500
451 LPLLKGDLR I QHTVTASVRL SYGEDLQMDW DGRGKLLVKL SPVYAGKTCG 550
501 LCGNYNGNQG DDPLTPSGLA EPRVEDFGNA WKLHGDCQDL QKQHSDFCAL 600
551 NPRMTRFSEE ACAVLTSPTF EACHRAVSPL PYLRNCRYDV CSCSDGRECL 650
601 CGALASYAAA CAGRGVRVAW REPGRCELNC PKGQVYLQCG TPCNLTCRSL 700
651 SYPDEECNEA CLEGCFCPFPG LYMDERGCDCV PKAQCFCYD GEIFQPEDIF 750
701 SDHHTMCYCE DGPMHCTMSG VPGSLLPDAV LSSPLSHRSK 741
      R

```

配列番号 : 2

トポロジー : 直鎖状

配列の長さ : 60

配列の種類 : ペプチド

配列の型 : アミノ酸

配列 :

鎖の数 : 1 本鎖

```

1                               10                               20
Ser Phe Asp Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg Asp
5'- AGC TTT GAC AAC AGA TAC TTC ACC TTC AGT GGG ATC TGC CAG TAC CTG CTG GCC CGG GAT
1                               60
21                               30                               40
Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys Ala Asp Asp Arg Asp
TGC CAG GAC CAC TCC TTC TCC ATT GTC ATT GAG ACT GTC CAG TGT GCT GAT GAC CGC GAC
61                               120
41                               50                               60
Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys
GCT GTG TGC ACC CGC TCC GTC ACC GTC CGG CTG CCT GGC CTG CAC AAC AGC CTT GTG AAA -3'
121                               180

```

配列番号 : 3

40 トポロジー : 直鎖状

配列の長さ : 94

配列の種類 : ペプチド

配列の型 : アミノ酸

配列 :

鎖の数 : 1 本鎖

```

1                               10                               20
Gly Ser Pro Gly Ile His Phe Lys Ser Phe Asp Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile
5'- GGA TCC CCG GGA ATT CAC TTC AAG AGC TTT GAC AAC AGA TAC TTC ACC TTC AGT GGG ATC
1                               60

21                               30                               40
Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr
TGC CAG TAC CTG CTG GCC CGG GAT TGC CAG GAC CAC TCC TTC TCC ATT GTC ATT GAG ACT
61                               120

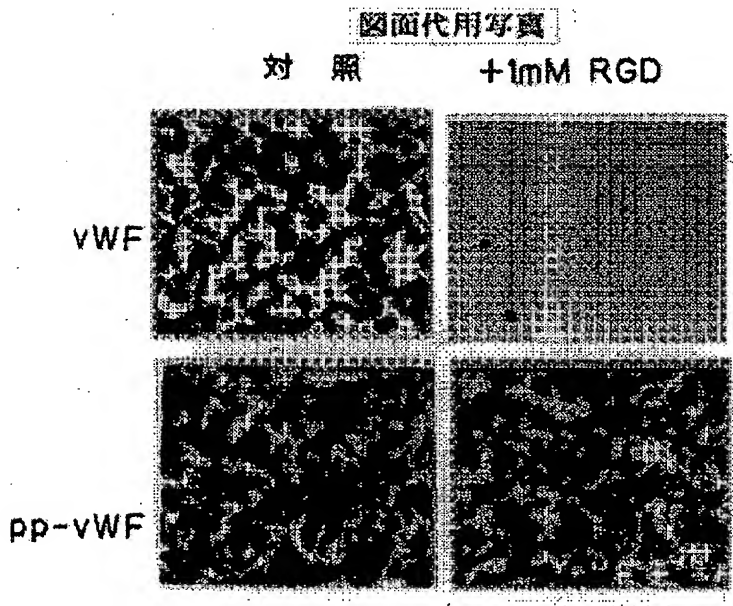
41                               50                               60
Val Gln Cys Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu Pro
GTC CAG TGT GCT GAT GAC CGC GAC GCT GTG TGC ACC CGC TCC GTC ACC GTC CGG CTG CCT
121                               180

61                               70                               80
Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val Ala Met Asp Gly Gln
GGC CTG CAC AAC AGC CTT GTG AAA CTG AAG CAT GGG GCA GGA GTT GCC ATG GAT GGC CAG
181                               240

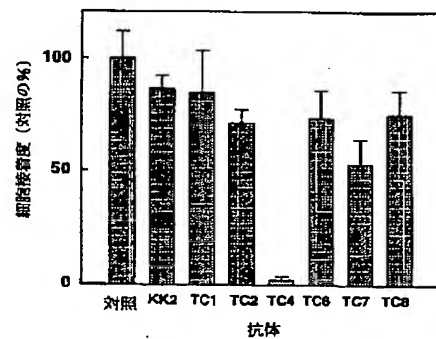
81                               90                               94
Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Glu Phe Ile Val Thr Asp
GAC ATC CAG CTC CCC CTC CTG AAA GAA TTC ATC GTG ACT GAC -3'
241                               282

```

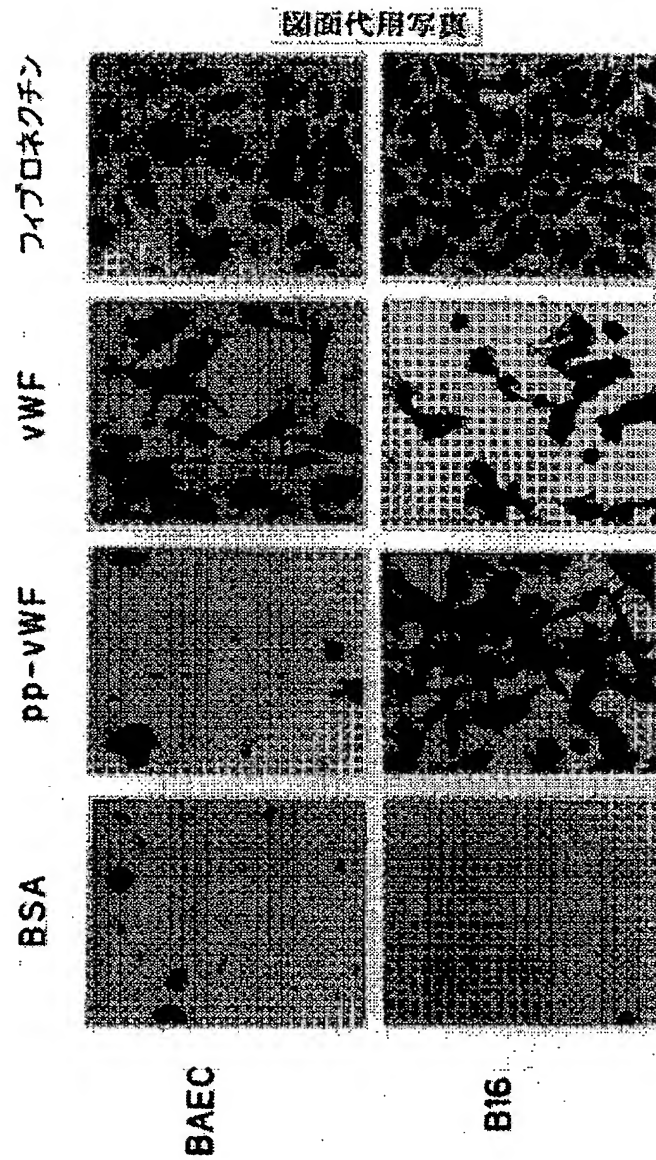
【図 2】



【図 5】

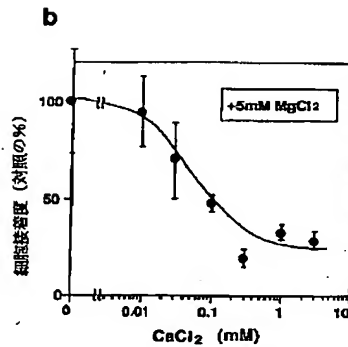
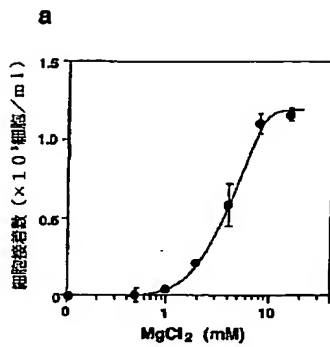


【図 1】

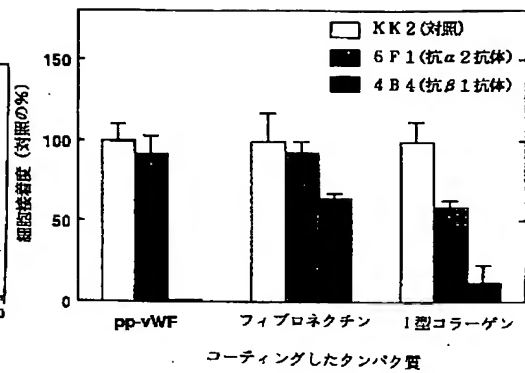




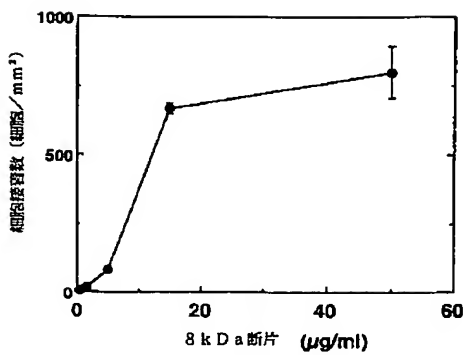
【図 3】



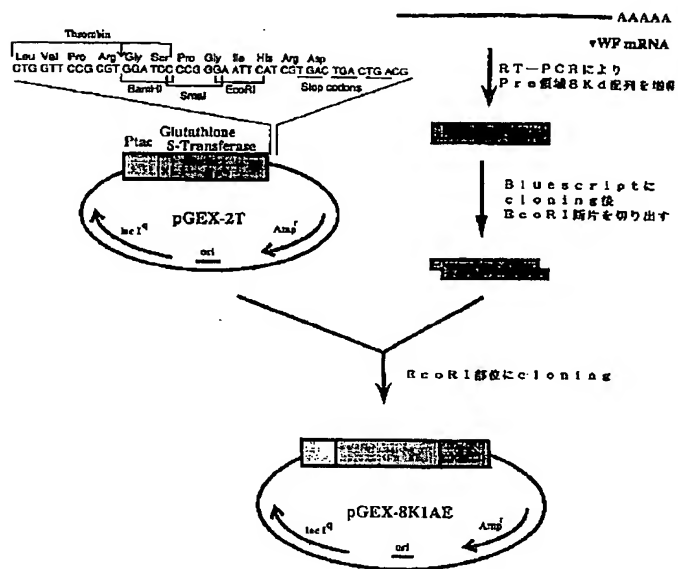
【図 4】



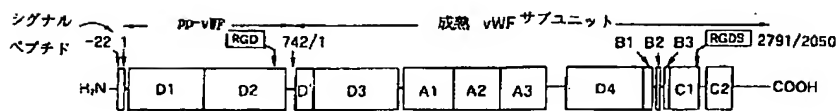
【図 6】



【図 7】



【図 10】

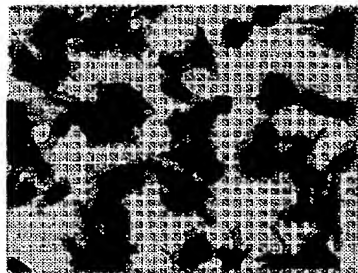


プレプロ-vWF の構造

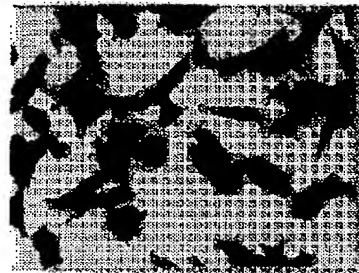
【図 8】

## 図面代用写真

pp-vWF と rec 8k へのメラノーマ細胞の接着



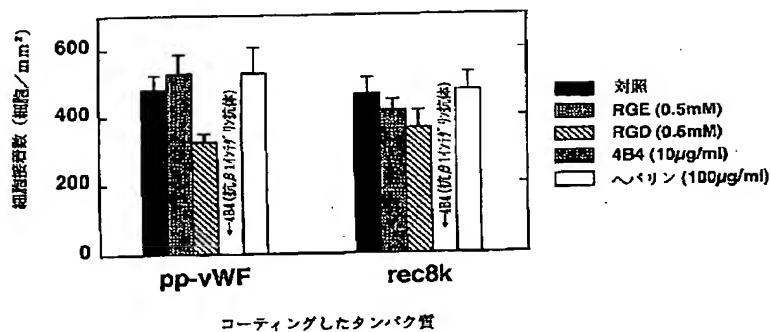
pp-vWF



rec 8k

【図 9】

RGD, ヘパリン、抗β1インテグリンの阻害



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:19)

(72) 発明者 須戸 良光

神奈川県相模原市東林間 8-17-3 コー  
ポ広美105号

(72) 発明者 清水 朗

大阪府大阪市中央区北浜 4 丁目 5 番 33 号  
住友金属工業株式会社内

(72) 発明者 奥野 貢広  
大阪府大阪市中央区北浜 4 丁目 5 番 33 号  
住友金属工業株式会社内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**